# 第2708168号

(45) 発行日 平成10年(1998) 2月4日

(24)登録日 平成9年(1997)10月17日

	技術表示箇所
C 1 2 N 1/21	
C 1 2 P 21/02	С
C 1 2 N 15/00	Α
数 <b>少</b> 百0	)数8(全 10 頁) 最終頁に続く
инж-жо.	一—————————————————————————————————————
(73)特許權者 999999	999
4	工株式会社
	医区芝大門1丁目13番9号
B	x+3 大田区多库川 2 24 25 昭和館
4	会社生化学研究所内
li .	
1	M 大田区多摩川 2 — 24—25 昭和電
	N田区多率//12 12 23 12 12 12 12 12 12 12 12 12 12 12 12 12
1	大田区多摩川 2 —24—25 昭和電
	会社生化学研究所内
1	大田区多摩川 2 — 24 — 25 昭和電
1	会社生化学研究所内
(74)代理人 弁理士	青木 朗 (外4名)
審査官 植野 浴	吉志
	C12P 21/02 C12N 15/00 游求項の (73)特許極者 99999999 昭和東京 東京和 東京都 (72)発明者 京京本 工株式会 (72)発明者 東京株式会 (72)発明者 東京株式会 (72)発明者 東京株式会 (72)発明者 東京株式会 (72)発明者 東京株式会 (74)代理人 弁理士

### (54)【発明の名称】 微生物の改良

### (57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】目的物質の生産に係わる遺伝子(目的遺伝子)を含有する染色体を有する微生物の該染色体に、該目的遺伝子のための発現制御配列が、該目的遺伝子の発現を制御することができる位置及び方向で導入されている改良された微生物であって、前記発現制御配列が、該発現制御配列の一端又は両端に付加された前記目的遺伝子のDNA配列の部分と相補的な配列による相同的交叉により導入されたものであることを特徴とする微生物。

【請求項2】前記数生物がパチルス (Bacillus) 属数生 10 物である請求項1に記載の微生物。

【請求項3】前記徴生物がパチルス・ズブチリス (Bacillus subtilis) 又はパチルス・アミロリクエファシエンス (Bacillus amyloliquefaciens) である請求項2に記載の微生物。

【請求項4】前記発現制御配列がプロモーターであり、 該プロモーターが前記遺伝子の上流に押入されている、 請求項1~3のいずれか1項に記載の微生物。

【請求項5】該プロモーターがパチルス属像生物のプロモーター又は、パチルス属像生物のファージのプロモーターであり、該プロモーターが前記遺伝子の上流に挿入されている、請求項4に記載の微生物。

【請求項6】前記遺伝子がトリプトファンの合成に係る遺伝子である請求項1~5のいずれか1項に記載の徴生物。

【請求項7】目的物質の生産に係わる遺伝子(目的遺伝子)を含有する染色体を有する微生物の該染色体に、該目的遺伝子のための発現制御領域を、該目的遺伝子の発現を増強することができる位置及び方向で導入することを特徴とする改良された微生物の製造方法において、前

記発現制御配列を、該発現制御配列の一端又は両端に付加された前記目的遺伝子のDNA配列の部分と相補的な配列による相同的交叉により導入することを特徴とする方法。

【請求項8】特許請求の範囲第1項に記載の整生物を培養して該遺伝子に係わる生成物を生産せしめ、そして該生成物を採取することを特徴とする有用物質の製造方法。

### 【発明の詳細な説明】

### (産業上の利用分野)

本発明は有用微生物の新規な改良方法及び該改良方法により製造された微生物、並びに該微生物を用いる有用物質の製造方法に関する。本発明の做生物の改良方法は、既存の遺伝子を含有する染色体に、該遺伝子の発現を制御することができる発現制御配列を外部から導入することを特徴とする。

### (従来の技術)

超換えDNA技術の発展、進歩によってホルモン、ワクチン、インターフェロン等の蛋白質や酵素、アミノ酸、するらにピタミンや抗生物質などの二次代別産物に至るまので、微生物中で大量生産が可能となった。これは、物質生産に係わる特定の遺伝子を適当な多コピー数のプラスミドを適当な数上にクローン化し、該プラスミドを適当な数上により連伝子を適当な物、した遺伝子を発現させることにより達成される。この際、括性の高いプロモーター遺伝子を有するプラスミドベクターを用いて、プロモーター遺伝子と目的遺伝子を機能的に連結することにより、遺伝子の発現はより効率的に行われる。しかしながら、プラスミドの脱落が起こったり、プラスミドに変異や欠失が生じる等の為、プラスミドペクターを用いた物質生産は一般的に不安定であり安定的な物質生産には不適当なことがある。「III

これに代る方法として、宿主做生物の染色体に目的遺伝子をインテグレーションせしめる方法があり、この方法によれば外部から導入された遺伝子を多世代にわたって安定に維持することができるが、該遺伝子の増幅度を上げることが困難であり、このため目的とする生成的の生産性に限界があるという欠点が存在する。

### [発明が解決しようとする課題].

でって、目的の物質に係る遺伝子が染色体に安定に維 40 持されており、しかも該遺伝子が強力に発現され、目的物質を効率よく生産することができる微生物及びその創成方法が強く求められている。

### (課題を解決するための手段)

本発明者等は、上記の問題点を解決すべく種々検討した結果、特定の目的物質の生産に係わる遺伝子をすでに含有する微生物染色体に、該遺伝子の発現を増強することができる強力なプロモーターを導入することにより、目的物質を効率よく生産することができる微生物が得られることを見出し、この発明を完成した。

従って、本発明は、目的物質の生産に係わる遺伝子 (目的遺伝子) を含有する染色体を有する微生物の談染 色体に、該目的遺伝子のための発現制御配列が、該目的 遺伝子の発現を制御することができる位置及び方向で導 入されている改良された欲生物であって、前記発現制御 配列が、該発現制御配列の一端又は両端に付加された前 記目的遺伝子のDNA配列の部分と相補助的な配列による 相同的交叉により導入されたものであることを特徴とす る最生物;目的物質の生産に係わる遺伝子(目的遺伝 子)を含有する染色体を有する微生物の該染色体に、該 目的遺伝子のための発現制御領域を、該目的遺伝子の発 現を増強することができる位置及び方向で導入すること を特徴とする改良された微生物の製造方法において、前 記発現制御配列を、該発現制御配列の一端又は両端に付 加された前記目的遺伝子のDNA配列の部分と柑補的な配 列による相同的交叉により導入することを特徴とする方 法;並びに、該做生物を培養して該遺伝子に係る生成物 を生産せしめ、そして該生成物を採取することを特徴と する有用物質の製造方法、を提供しようとするものであ

### (具体的な説明)

本発明は、目的物質の生産に係る遺伝子をすでにその 染色体中に有し該目的物質を生産することができる微生 物、及び目的物質の生産に係る遺伝子をすでにその染色 体中に有するが該目的物質を実質上生産することができ ず新たに外部から発現制御遺伝子を導入することにより 該目的物質を生産することができる様になる微生物、の いずれにも適用することができる。この様な微生物とし **て、例えばパチルス (Bacillus) 属、エシェリシア (Es** sherichia) 属、セラチア (Seratia) 属、シュードモナ ス (Psudomonas) 属、プレビバクテリウム (Brevibacte rimm) 属、コリネパクテリウム (Corynebacterium) 属 等に属する欲生物を挙げることができる。バチルス属に 属する微生物の例として、例えばパチルス・ズブチリ ス、パチルス・アミロリクエファシエンス、パチルス・ リケニホルミス、パチルス・ステアロサーモフィラス等 を挙げることができる。

本発明の方法により製造される目的物質は、遺伝子の 直接的な発現生成物である蛋白質又はポリペプチド、例 えば各種の酵素類、例えばプロテアーゼ、アミラーゼ、 グルコースイソメラーゼ、セルラーゼ、トリプトファン シンセターゼ;各種のペプチド性ホルモン類、例えばイ ンシュリン、成長ホルモン、エンケファリン、ソマトス タチン;各種の抗原類、例えば肝炎ワクチン、ポリオワ クチン、ヘルペスワクチン;各種のリンホカイン類、例 えばインターフェロン、インターロイキン等であること ができる。

本発明の方法により製造される目的物質はまた、遺伝子の直接的発現生成物である1又は複数の酵素の触媒作 50 用により生産される物質であることができる。この様な

物質の例として複数のトリプトファン合成関連酵素によ り合成されるレートリプトファン、複数のスレオニン合 成関連酵素により合成されるレースレオニン、複数のプ リンヌクレオチド合成酵素により合成されるイノシンや グアニン等を挙げることができる。この様な目的物質の 生産に保わる遺伝子としては、宿主微生物の染色体中に 本来存在する遺伝子であってもよく、又あらかじめ宿主 **敬生物の染色体中に人為的に挿人しておいた遺伝子であ** ってもよい。前者の遺伝子はその遺伝子に天然に付随す る発現制御配列を有しており、これに加えて本発明の方 10 法により追加の発現制御配列を挿入することにより、槽 主による目的物質の生産を増強することができ、あるい はもともと目的物質を実質的に生産しなかった宿主に目 的物質を生産する能力を付与することができる。後者の 場合も、多く場合その構造遺伝子に付随する発現制御館 域を有しており、本発明の方法による強力な発現制御配 列を導入することにより、前記のごとき効果を得ること ができる。あらかじめ挿入された遺伝子がその発現制御 配列を伴っていない場合には、そのまま宿主徴生物は目 的物質を生産することができないが、本発明の方法によ り発現制御配列を人為的に挿入することにより該宿主徴 生物に目的物質を生産する能力を付与することができ る。この様は遺伝子を含有する微生物の具合例として、 枯草菌類のトリプトファン合成に係わる遺伝式とクロラ ムフェニコール耐性遺伝子を試験管内でライゲーション せしめ、トリプトファン生産菌である岩草菌類の染色体 中に両遺伝子をインテグレーションさせることにより創 製された、安定的に両辺伝子産物及びトリプトファン生 産する微生物が挙げられる(特開昭61-85184、**及び特** 開昭61-88873)。

発現制御配列としては例えばプロモーター、ターミネーター、SD配列、オペレーターが挙げられ、これらは特定の発現制御配列に依存して通常は染色体にあらかじめ存在する、目的物質の生産に係わる構造遺伝子の上流又は下流に、該構造遺伝子の伝写方向に合わせて挿入される。前記制御配列の典型的な例はプロモーターであり、これは一般に前記構造遺伝子の上流に該構造遺伝子の転写方向に合わせて挿入される。例えば、ある特定の宿主後生物については、該微生物中に天然に存在するプロモーターをクローン化したもの、又は該微生物のファージャに天然に存在するプロモーターをクローン化したもの、あるいはこれらのプロモーターに由来するハイブリドプロモーター等を使用することができる。プロモーターはまた、化学合成されたものであってもよい。

挿入すべき発現制御領域は通常、宿主微生物中で増幅することができるブラスミドにより、あるいは宿主微生物中で増幅することができない現状又は線状のDRAとして導入される。目的とするDNAを宿主微生物に導入するための方法として、DNAを細胞に挿入するために通常用いられる方法のいずれか、例えばカルシウムセル法(文

献J. Bacteriol., <u>119</u>, 1072(1974))、コンピテントセル法(文献Gene, <u>1</u>, 153(1977))、プロトプラスト形質転換法(Molec. Gen. Genet. <u>168</u>, 111(197)〕等を用いることができる。

プロモーター等の発現料御配列を宿主微生物の取色体にインテグレーションする方法としては一般に、いわゆる相同的交叉が用いられる。このため、挿入されるべき制御配列はその一端又は両端に、染色体にすでに存在している目的生成物の生産に係わる適伝子のDNA配列と相同なDNA配列を有することが好ましい。

本明細書においては、具体例として、宿主徴生物としてパチルス・アミロリクエファシエンスを用い、目的物質の生産に係わる遺伝子としてトリプトファンオペロンを構成する遺伝子を用い、発現制御配列としてパチルス・アミロリクエファシエンス由来のプロモーター又はパチルス・ズプチリスに感染するSPO2ファージ由来のプロモーターを用いる。以下に、この具体例を実施例として記載する。

なお、実施例において酵素反応条件はおよそ次の通り 20 とした。

Hind III消化

反応媒体:100mM Tris-Hcl (pH7.5),50mM NaCl,5m M MgClz

酵素量 :DNA1 ugに対して5ユニット

反応条件:37℃にて60分問

Hind III部分消化

反応媒体:100mM Tris-HCl (pH7.5),50mM NaCl,5m M MgCl:

酵素量 :DNA1μgに対して0.1ユニット~1ユニッ 30 ト

反応条件:37℃にて60分問

Sma I 消化

反応媒体:10mM Tris-HCl (pH8.0),20mM KCl,7mM MgCl;

酵素量 :DNA1μgに対して10ユニット

反応条件:37℃にて60分間

Xba I 消化

反応条件:100mM Tris-HC1 (pH7.5),50mM NaC1,5m M MgC1,

酵素量 :DNA1μgに対して5ユニット

反応条件:37℃にて60分間

EcoR I消化

反応媒体:100mN Tris-HCl (pH7.5),50mM NaCl,5m M MgCl;

酵素量 :DNA1μgに対して5ユニット

反応条件:37℃にて60分間

BamH I消化

反応媒体:100mM Tris-HCl (pH7.5),50mM NaCl,5m M MgCl:

酵素量 :DNAIμgに対して10ユニット

反応条件:37℃にて60分間 DNAポリメラーゼ I

Klenowフラグメント

(poi I) 処理 100mM Tris-HC! (pH7.5),50mM NaC!, 5mM MgCl<sub>2</sub>の緩衝液中で消化された1μgのDNA (20μ e) に対して、NNAポリメラーゼ I・Kienowフラグメン トを3ユニット(1μℓ)、各dXTP2n mole (2mX容液を 1μℓ) 加え、室温で30分間インキュペーションする。 細菌アルカリ性ホス

ファーターゼ (BAP)

処理 制限酵素で消化された 1 μg DNA溶液に対して 0.3ユニットのBAPを加え、55℃、30分間インキュペーシ ョンする.

T4 NDAガーゼ

による連結 100mM Tris-HCl (pH7.5),50mM NaCl,5 .mM MgCl,中で消化された各DNA溶液を混合後、100μMに 」なる様にATPを加え、さらにT4 DNAリガーゼを30ユニッ ト添加し、15℃で1夜インキュペーションする。

実施例1. パチルス・アミロリクエファシエンスからのプ ロモーターのクローニング及びマーカーの付与(第1 図)

ます、プロモーター検索グクターpCRZU (Nature, 293. 309 (1981) Goldfarb, D.S.et al.) (このベクターは当 業界において広く使用されており、容易に入手すること ができる。)を制限酵素Hind IIIで消化し、これと同じ く制限酵素Hind IIIで消化したパチルス・アミロリクエ ファシエンスIAM 1521の染色体DNAとを試験管内で混合 し、T4 DNAリガーゼを用いて連結反応を行った後、パチ ルス・ズブチリス[10] 0531 (東京大学応用微生物研究 所) にプロトプラスト形質転換法 (S. Chang & S. N. Coh 30 en, Molec.gen.Genet. 168, 111 (1979) ) で導入し、25pp nのクロラムフェニコールを含むL窓天ブレートに生え る形質転換体を多数取得した。次にこの形質転換体のク ロラムフェニコール耐性度およびクロラムフェニコール アセチルトランスフェラーゼの活性を測定し、活性が一 番高い形質転換体パチルス・ズブチリネTFK756を高活性 プロモーターがクローン化されている株として選んだ。 TFK756からプラスミドを分離・精製し、クローン化され ていた0.3MDの大きさのHind III所片DNAをプロモーター 括性を有する配列P756と命名、P756がクローン化された pGR 71をpSDK 756と命名した。

次にpSDK 756のP756プロモーターの上流にマーカーと してのテトラサイクリン耐性遺伝子を組込む為に枯草菌 プラスミドpTP5を制限酵素Hind!!!で消化し、これと同 じく制限酵素Hind IIIで部分消化したpSDK 756とを混合 し、T4 DNAリガーゼを用いて結合反応を行った後、大腸 歯C600に形質転換を行い、テトラサイクリン耐性で、か つクロラムフェニコール耐性となる形質転換体を得た。 これによりpSDK 756のP756上流に1.5MDのテトラサイク リン耐性遺伝子を組込んだプラスミッドpSDK27364を作 60 37℃で1 夜培養後に、テトラサイクリン耐性の形質転換

製した。

さらに図1に示したようにまずpSDK 27364を制限酵素 Hind IIIで部分消化し、Klenow Pragmentと4種のXTPを 角いて、平滑末端を作った。次に、Sma Iで消化しBAPで 脱リン酸化したpUC 18と混合し、T4 DNAリガーゼを用い て結合反応を行い、大腸菌JM 109に形質転換を行い、プ ラスミ NpSDK27365を含む、アンピシリン、テトラサイ クリン耐性を示す形質転換体をスクリーニングした。こ れにより、テトラサイクリン耐性のマーカーが付与され 10 たP756を有するDNA断片の調型ができるプラスミドが取 得された。

実施例2、プロモーターP756導入用DNAの調製及び宿主株 への導入(第2図)

前記プラスミドpSDK 27365をEcoR I及びXba Iで消 化、アガロース電気泳動により分離し、フェノール抽出 **及びエタノール沈嚴により精製することにより、テトラ** サイクリン耐性遺伝子及びプロモーターP756を含有する 1.20DのEcoR I-Xba l断片を調製した。

一方、パチルス・アミロリクエファシエンスの上リブ トファン合成系遺伝子が大腸菌プラスミドpBR322にクロ ーニングされているプラスミ KpSDT1111 を制限酵素EcoR 1及びXba 「で消化し、アガロースケル電気泳動により 分離し、そしてフェノール抽出及びエタノール沈緑によ り精製することにより、トリプトファン合成系遺伝子の 上流部分を含有する2.5MDの大きさのEcoR I-Xba !フラ グメントを得た。なお、前記プラスミドpSDT1111を含有 する大腸菌は、工業技術院改生物工業技術研究所に做工 研菌等第7861号(FERMP - 7861)として寄託されてい る.

次に、両フラグメント約1μgずつを混合し、T4 DNA リガーゼを用いて連結反応を行い、これを用いてバチル ス・アミロリクエファシエンスのトリプトファン生産株 パチルスSD30のコンピテントセルを次の様にして形質転 換した。

まず、TBAB寒天培地(Difco社、Bacto TryptoselOg、 Bacto Beef Extract 3g, NaCl 5g, Bacto Agar 15g;H-0 14) で阿線培養したパチルスSD30をCI培地(LEDO, 1 **4g、KH』PO4 6g、(NII4)』SO4 2g、クエン酸ナトリウム** ・201:0 1g、MgSO4・7E50 5ml、グリコース5g、カザミノ \_酸0.2g、レートリプトファン50ppm、H:0 1ℓ) に0D660 が0.05になる様に接種、37℃で振とう培養し、0D660が 約0.5になった時点で遠心分離(4000rpm、10分間)し、 沈斎をC 11培地(KrHPO1 14g、KH:PO4 6g、(NH1)2SO4 2g、クエン酸ナトリウム・2H:0 lg、MgSO4・7H:0 5m M、グルコース5g、カザミノ酸0.1g、L-トリプトファ "ンSppu)で、2倍に希釈されるように懸濁した。さらに 37℃で振とう培養を続け、30分後に、逮結反応を行なっ たDNA溶液を加え、37℃で接どうを1時間行ない、テト ラサイクリンを5ppm含むTBAB寒天培地に盤布した。

体が取得された。

この様にして、相同的交叉によりプロモーターP756が 染色体上のトリプトファン合成系遺伝子のすぐ上流にイ テングレーションされ、目的とするトリプトファン生産 株が得られた。この相同的交叉の結果を第2図に模式的 に示す。

例3. (参考例) ファージSPO2由来のプロモーターとトリプトファン合成系遺伝子を含有するプラスミドの調製 及びその宿主への導入 (第3図)

第3図に示す出発プラスミドpSDB 136は、枯草菌ファージSP02由来のプロモーター (P201)を含有する0.17kDのEcoR 「フラグメントを含有し、その下流に制限酵業切断点Bami I、Sal 「及びPst iを含み、さらにその下流にバチルス・プミルス (Bacillus pumilus)由来のクロラムフェニコール耐性遺伝子の構造遺伝子を含有する5MDの大きさのプラスミドである。該プラスミドはpHL708 (Gene, 16, 199 (1981)) (Bacillus Genetic Stock Center, オハイオ・ステート・ユニバーシティーから商業的に入手することができる。)をEcoR 「とBgI IIで消化し、EcoR 「とBami Iで消化したpBR322と混合、T4 DNAリガーゼで結合反応後、大腸菌c600に形質転換を行ない、得られたクロラムフェニコール耐性の形質転換体から調製される。

プラスミドpSDB 136を制限酵素Bam Iで消化し、次に大腸菌DNAポリメラーゼのKlenowフラグメントで処理した。他方、プラスミドpSDT 111を制限酵素EcoR Jで清化し、次に大腸菌DNAポリメラーゼIのKlenowフラグメントで処理した。両DNA断片を混合した後、T4 DNAリガーゼにより連結し、この生成物を用いてトリプトファン要求性大腸菌JA 221を形質転換した。得られたトリプトファン事求性大腸菌JA 221を形質転換した。得られたトリプトファン事求性大腸菌JA 221を形質転換した。得られたトリプトファンコール耐性の形質転換体よりプラスミドを抽出、分析してSP02ファージ由来プロモーターとトリプトファン合成系遺伝子を合むフラグメントが機能的に連結している大きさ10MDの組替えプラスミドpSEY1213が得られた。

このプラスミドpSEY1213を用い、実施例1に記載したのと同様にしてパチルス・アミロリクエファシエンスのトリプトファン生産株パチルスSD-30のコンピテントセルを形質転換した。こうして、相同的交叉によりプロモーターP201が染色体上のトリプトファン合成形遺伝子の 40すぐ上流にインテグレーションされ、目的とするトリプトファン生産株が得られた。この相同的交叉の結果を第3図に模式的に示す。

# 実施例4. トリフトファン合成系酵素類の発現

細菌染色体上のトリプトファン遺伝子近傍に、プロモーター配列を挿入した菌株パチルスSD1034、及びパチルスSD1035の生産する酵素トリプトファンシンセターゼおよびアントラニール位シンセターゼの量を両酵素の活性制定により削った。

プロモーターの導入されていない親株パチルスSD30、

並びにプロモーターが導入されている株パチルス SD103 4、及びパチルス SD1035をTBAB寒天培地 (Difco社) で前培養し、Spizizen最少培地100m!にOD (660nm) が約0.03になるように接種し、37℃でOD (660nm) が約0.5になるまで振とう培養した。5000 rpm、15分間冷却違心を行い、沈藏をパッファーI (0.025M KHz PO.、0.075M KHz PO. 0.075M KHz PO. 0.07

10

Method in Engymolgy, <u>5</u>,794 (1962) に従って行った トリプトファンシンセターゼ活性測定の結果、およびGe netics, <u>52</u>,1303 (1965) に従って行ったアントラニール 酸シンセターゼ活性測定の結果を示す。

菌件	トリプトファンシン セターゼ活性	アントラニール 酸シンセターゼ		
2030	100	100		
SD1034	250	300		
SD1035	300	320		

バチルスSD1034においては、P756プロモーター及びアントラニール酸シンセターゼ遺伝子を含有するトリプトファン合成系遺伝子の上流部分が宿主細菌の染色体上のトリプトファン合成系遺伝子の近傍に導入されており、この結果として染色体上に元から存在したトリプトファン合成系の遺伝子の発現が強化されていると共に、追加のアントラニール酸シンセターゼ活性が約2、5倍に増強され、アントラニール酸シンセターゼ活性が約3、0倍に増強された。他方、バチルスSD1035においては、トリプトファン合成系遺伝子の2倍体が形成されており、さらにその片方のトリプトファン合成系遺伝子近傍にP201プロモーター配列DNAが導入されていることにより、アントラニル酸シンセターゼ活性、及びトリプトファンシンセターゼ活性が3~3、2倍増強された。

## 実施例5. レートリプトファンの製造

グルコース 5 %、 硫安0.2%、 をHPO。1.4%、 KH-PO。
40 0.6%、クエン酸ナトリウム・2H-0 1g、 MgSO4・7H-0 0.02%、FeSO4・7H-0 1ppm、MnSO4 1ppmを含む培地 (pH7.0) 2Lにアントラニル酸800ppmを添加し、これにプロモーターの導入されていない親株パチルスSD3O3・並びにプロモーターが導入された株パチルスSD1034、 及びパチルスSD1035を植菌し、35℃で5Lのジャーファメンターで通気撹はん培養した。培養中、アントラニル酸濃度が50ppm以下まで減少した時点でアントラニル酸濃度が約1000ppmになるように適宜追加添加し、また培養途中グルコースを100g治加し、更にアンモニア水の緩加により培地のPHを7.0±0.4に保ちながら15時間培養した。培養液中に

-99-

装積されたレートリプトファンの量を高速液体クロマト グラフィーにより測定した結果を下に示す。

菌株	Lートリプトファン蓄積(g/L)			
\$030	4.7			
SD1034	8,9			
SD1035	15, 1			

上の表から明らかな様に、本発明のプロモーターの導 人によって染色体上のトリプトファン合成系遺伝子の発 倍のトリプトファンを蓄積した。他力、プロモーターの ほかに追加のトリプトファン合成系遺伝子が導入された パチルスSD1035は親株SD30に比べて約3倍の下リプトフ アンを蓄積した。

#### 実施例6.

パチルスSD1034、及びパチルスSD1035に於いてプロモ ーター配列DNAがトリプトファン遺伝子の近傍に導入さ れていることは次の様なサザンハイブリダイゼイション 法により確認した。

パチルスSD1034、及びパチルスSD1035をし培地300ml 20 で35℃、1夜振とう培養して、通常のDNA抽出法(Bioch em. Biophys. Acta72,619, (1963) ) により染色体DNAを 抽出・精製し約1mgを得た。各DNA1μgずつを制限酵素B amH I、EcoR I、Xba Iで夫々完全に消化し、アガロース **電気泳動を行った。常法に従ってアルカル変性、中和** 後、ニトロセルロースフィルターにDNAをトランスファ ーした。フィルターを洗浄後、80℃で2時間熱処理し

プロープDNAとして別に精製したトリプトファン遺伝 子を含む5MDのRcoR IフラグメントとP756プロモーター 30 を含む0.3MDのHind IIIフラグメントとP201プロモータ 一を含む0、18MDのRcoR 1フラグメントをニックタロンス 『レーション法により〔ァーススア〕dCTPでラベルして比括 性40 µ Ci/100mgのプロープDNAを作製した。

前述のフィルターをプレイハイブリダイゼーション溶 液 (6×SSC、5×デンハルト溶液中で42℃2時間イン キュペーションの後40μCiのプロープDNAと50%ホルム アミドを含むハイブリダイゼーション溶液(6×SSC、 2×デンハルト溶液中で42℃1夜インキュペーションし た。次にフィルターを2回、37Cで15分間緩衝液 (2× 40

SSC) 中でインキュペーションし低塩濃度の緩衝液(0.1 ×SSC) に移し、2回、37℃で5分間洗浄した。フィル ターの水分を拭きとりコダックXAR5フィルムを用いてー 80℃で3時間オートラジオグラフィーを行った。

その結果、パチルスSD1034の場合、Bass Iで消化した 7MDの大きさ付近にトリプトファン遺伝子を含むフラグ メントプロープでも、P756を含むフラグメントプローブ でもシグナルが生じた。又、EcoR Iで消化した4.3MDの 大きさ付近にトリプトファン遺伝子を含むフラグメント 現が増強されたパチルスSD1034は親体SD30に比べて約2 10 プローブでもP756を含むフラグメントプローブでもシグ ナルが生じ、更にXba Iで消化した。4.3MDの大きさ付近 にもトリプトファン遺伝子を含むフラグメントプローブ でもP756を含むフラグメントプローブでもシグナルが生 じた。従ってバチルスSD1034のトリプトファン遺伝子付 近の構造は第2図のようであり、プロモーター配列がト リプトファン遺伝子の近傍に導入されていることが確認 された。

> パチルスSD1035の場合、Xba lで消化した10MDの大き さ付近にトリプトファン遺伝子を含むフラグメントプロ ープでもP201を含むフラグメントプローブでもシグナル が生じ、相同的交叉の結果、第3四に示すように、プロ モーター配列がトリプトファン遺伝子の近傍に導入され ていることが確認された。

### [本発明の効果]

本発明に従えば、プラスミドを用いた遺伝子均幅と異 なり、安定的に微生物の生産する特定の物質を多量に工 、業的に生産することが可能となる。さらに遺伝子増幅に 於いては、目的の遺伝子が完全無傷でないとその目的を 達成することができないが、本発明では目的遺伝子の上 流部分と任意のプロモーターDNAさえあれば、簡単にそ の目的が達成される。

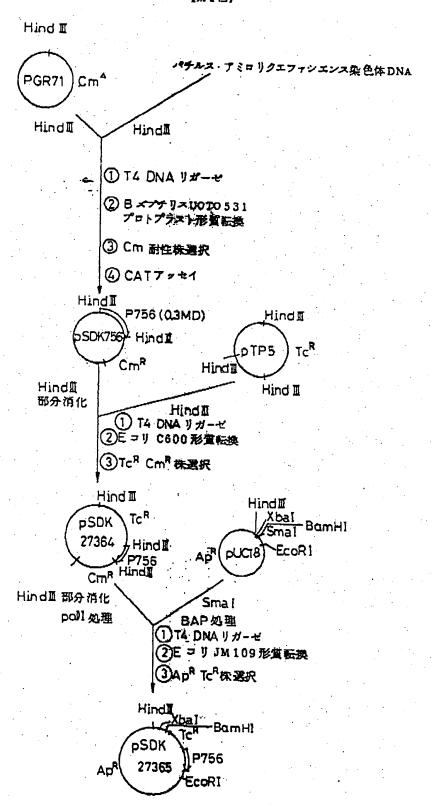
### 【図面の簡単な説明】

第1図は、プロモーター配列DNAのクローニング方法を 示す。

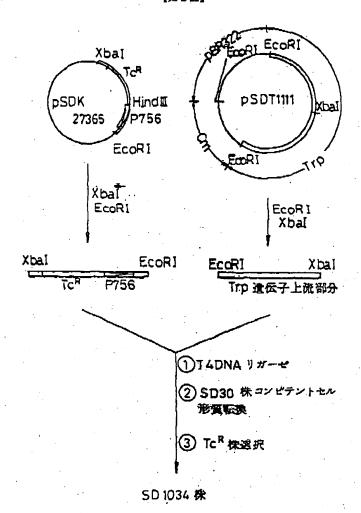
第2図は、プロモーター配列DNAとトリプトファン遺伝 子上流部分の細菌への導入方法を示す。

第3図は、プロモーター配列下流へトリプトファン遺伝 子が組み込まれたDNAの調製法、及び細菌への導入方法 を示す。

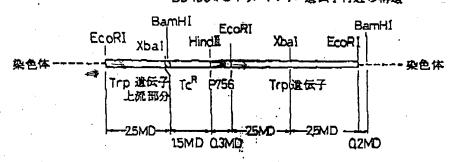
### 【第1図】



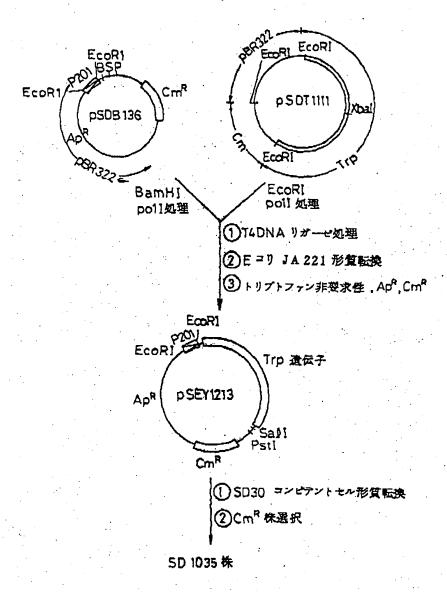
## [第2図]



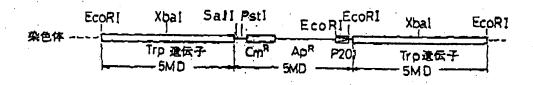
# SD 1034のトリプトファン遺伝子付近の構造



### 【第3図】



# SD 1035 のトリプトファン遺伝子付近の構造



#### フロントページの統合

(51) Int. C1.4		識別記号	庁内菸理番号	FI		技術表示個所
(C12N	1/21	•			•	<b>2</b> 113 <b>2</b>
C12R	1:07)					
(C12P	21/02					
C12R	1:125)	, .				•
(C12P	21/02		:	•		
C 1 2 R	1:07)			•		